

## 公開特許公報(A)

昭60-30682

Int. Cl.<sup>4</sup>

識別記号

序内整理番号

公開 昭和60年(1985)2月16日

C 12 N 9/26  
 (C 12 N 9/26  
 C 12 R 1:07)

7236-4B

審査請求 未請求 発明の数 1 (全4頁)

発明の名称  $\beta$ -アミラーゼの製造法

特 願 昭58-139918

出 願 昭58(1983)7月30日

発 明 者 中 井 國 治 知多市日長字神山村16番地

発 明 者 横 井 昌 正 愛知県西春日井郡西春日町野崎字乾出11

発 明 者 大 矢 隆 一 愛知県西春日井郡西春日町野崎字乾出15

出 願 人 天野製菓株式会社 名古屋市中区錦1丁目2番7号

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

 $\beta$ -アミラーゼの製造法

## 2. 特許請求の範囲

1 パチルス菌に属する $\beta$ -アミラーゼ生産菌をサイクロデキストリン、サイクロデキストリンを生成する酵素、イソマルトース、イソマルトースを生成する酵素または糖アルコールからなる群より選ばれた一種以上を含有せしめた培地に培養し $\beta$ -アミラーゼを生成産物せしめ、これを採取することを特徴とする $\beta$ -アミラーゼの製造法。

2 サイクロデキストリンが $\alpha$ -サイクロデキストリン、 $\beta$ -サイクロデキストリンまたは $\gamma$ -サイクロデキストリンである特許請求の範囲第1項記載の $\beta$ -アミラーゼの製造法。

3 サイクロデキストリンを生成する酵素がサイクロデキストリングルコシトランスフェラーゼである特許請求の範囲第1項記載の $\beta$ -アミラーゼの製造法。

4 イソマルトースを生成する酵素が $\alpha$ -D-

グルコシダーゼである特許請求の範囲第1項記載の $\beta$ -アミラーゼの製造法。

5 糖アルコールがソルビトールまたはマルチトールである特許請求の範囲第1項記載の $\beta$ -アミラーゼの製造法。

## 3. 発明の詳細な説明

本発明はパチルス菌に属する $\beta$ -アミラーゼ生産菌を培地に培養して $\beta$ -アミラーゼを生成産物せしめ、これを採取する方法において、培地に特定の添加物を含有せしめ $\beta$ -アミラーゼの生産を増強する方法に関する。

$\beta$ -アミラーゼ(系統名:1,4- $\alpha$ -D-グルコシトランスフェラーゼ(1,4- $\alpha$ -D-Glucosyltransferase), EC 3.2.1.2)は澱粉、グリコーゲン、デキストリンなどからマルトースを分解する酵素として有用である。従来 $\beta$ -アミラーゼの供給源としては主として高等植物、例えば大麥、小麥、大豆、甘藷などが利用されてきた。近年パチルス菌などの微生物に $\beta$ -アミラーゼの生産能力が見いだされたが、多くは生産性が低く、

用に至っているものは少ない。従来、バチルス属微生物による $\beta$ -アミラーゼ生産の改良法としては、例えば、バチルス・ノガタリウム (*Bacillus pasteurii*) を澱粉をきむ培地に培養する方法 (特公昭53-45363号公報)、バチルス・セラウス (*Bacillus cereus*) を澱粉をきむ培地に培養する方法 (特公昭53-5148号公報、同52-30590号公報、同52-30589号公報) 等が知られている。

本発明者はバチルス属微生物の $\beta$ -アミラーゼ生産性を更に増強すべく鋭意研究したところ、培地に従来にはない特定の添加剤を含有せしめることにより著しく $\beta$ -アミラーゼの生産性が高まることを知り本発明を完成するに至った。

即ち、本発明は、バチルス属に属する $\beta$ -アミラーゼ生産菌を培地に培養して $\beta$ -アミラーゼを生産増強せしめ、これを採取する方法において、培地にサイクロデキストリン、サイクロデキストリンを生産する酵素、イソマルトース、イソマル

トースを生産する酵素または糖アルコールからなる糖より選ばれる一種以上を含有せしめることを特徴とする $\beta$ -アミラーゼの製造法に関する。本発明においてサイクロデキストリンとしては $\alpha$ -サイクロデキストリン、 $\beta$ -サイクロデキストリンまたは $\gamma$ -サイクロデキストリンが例示される。サイクロデキストリンを生産する酵素としては $\alpha$ -サイクロデキストリングルコシドトランスフェラーゼ (*Cyclodextrin glucanotransferase*, EC 2.4.1.19)、イソマルトースを生産する酵素としては $\alpha$ -D-グルコシダーゼ ( $\alpha$ -D-Glucosidase, EC 3.2.1.20) が例示される。また糖アルコールとしてはソルビトールまたはマルチトールがそれぞれ例示される。

上記添加剤のうち $\alpha$ -D-グルコシダーゼは通常マルトースなどを基質としてその $\alpha$ -1,4-グルコシド結合を加水分解する酵素として知られている。特定の反応条件下では基質からグルコース残基を繰々の糖およびアルコールなどへ転移する活性、即ちトランスグルコシダーゼ活性を持つも

のがある。本発明で使用する $\alpha$ -D-グルコシダーゼはトランスグルコシダーゼ活性を有するものでなければならぬ。

本発明法で使用する微生物はバチルス属に属する $\beta$ -アミラーゼ生産菌であればいずれでもよく、例えばバチルス・セラウス (*Bacillus cereus*)、バチルス・ノガタリウム (*B. pasteurii*)、バチルス・サーネウランス (*B. cereus*)、バチルス・ポリミキサ (*B. polymyxa*) 等が示される。より具体的にバチルス・セラウス IF0 3001、バチルス・セラウス・バリエータス・ミコイデス (*B. cereus* var. *mycolides*) IAH 1190、バチルス・ノガタリウム IAH 1030、バチルス・サーネウランス IF0 3029、バチルス・ポリミキサ ATCC 8522などの保存菌株が例示される。

上記菌株を培養するための培地としては炭素源、窒素源、無機塩、有機酸および発育素などと前記特定の添加剤を含む培地であれば合成培地または天然培地のいずれでも用いることができる。例

えば、炭素源としてはシュクロース、アミロース、アミロペクチン、ポスタースターチ、コーンスターチ、コーンミール、ワキシスターチなど、窒素源としてはミルカゼイン、ポリペプトン、大豆カゼイン、酵母エキス、肉エキスなど、無機塩としては塩化ナトリウム、硫酸マグネシウム、リン酸ナトリウム、塩化亜鉛、塩化バリウム、硫酸バリウム、硫酸銅、塩化第二鉄、塩化カルシウム、リン酸一ナトリウム、リン酸二ナトリウムなど、有機酸としてはクエン酸ナトリウムなど、発育素としてはビタミンB<sub>1</sub>、ビオチン、ビタミンB<sub>6</sub>、 $\beta$ -パンチン酸ナトリウム、イノシトールなどが用いられる。

本発明で添加剤として用いるサイクロデキストリン、イソマルトースまたは糖アルコールは殺菌剤の培地に添加することでもできるが、サイクロデキストリングルコシドトランスフェラーゼ並びに $\alpha$ -D-グルコシダーゼは熱に弱いため、殺菌後の培地の温度が約30℃に冷却されたときに添加するようになしければならない。添加剤の培地中での

使用量は、例えばサイクロデキストリンおよびイソマルトースの場合は約0.001~1%（w/v）（以下同じ）、サイクロデキストリンとグルコトランスフェラーゼは約0.01~10u/ml、α-D-グルコシダーゼは1トランスグルコシダーゼ活性として約0.1~100u/mlまたは糖アルコールは約0.01~5%である。

本発明で使用する菌株の培養条件としては、培養温度は菌が生育しスターミラーが生産される範囲内であればよく、通常約25~35℃であり、培養のpHは約7.5~9.5である。また培養時間はスターミラーの活性が最大に達する時間を選べばよく、通常約50~70時間である。

以上のようにして得られた培養物からスターミラーを採取するには、公知の方法に従って行えばよい。例えば、まず遊心分離、ろ過などにより菌体を除去したのち、上清またはろ液を濃縮、有機溶媒を加えることにより粗酵素粉末が得られ、さらに限外ろ過、乾燥クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過などの公知

の方法を適宜組み合わせることにより精製スターミラーを単品が得られる。

本発明におけるスターミラーの活性の単位は、0.5%可溶性澱粉液（pH 7.0、リン酸緩衝液）を基質として40℃、30分間反応し、生じた還元糖量をフェーリング・レーマン・シュール（Fehling-Lohmann-Schuel）法により測定したとき、10mgのグルコースに相当する還元力のマルトースを生産する酵素量を1単位とした。また、添加剤として使用するサイクロデキストリンとグルコトランスフェラーゼおよびα-D-グルコシダーゼの活性単位はそれぞれラザレン・ハドソン（Lalzen-Hadson）単位（ジャーナル・オブ・アプライド・ケミカル・バイオテクノロジー、49, 491, Chem. Biotechnol.）第21巻、330頁、1971年）、トランスグルコシダーゼ単位（日本菌物協会雑誌、第72巻、459頁、1977年）によった。

以下、実施例を以て本発明を詳しく説明する。

#### 実施例 1

可溶性デンプン 1.0%、ミルカゼイン 3.5%

、酵母エキス 0.1%、塩化ナトリウム0.01%、硫酸マグネシウム、水素 0.1%、リン酸二カリウム 0.4%、グリシン 0.075%、ヒクミンB、塩酸塩 2ppm およびクエン酸ナトリウム0.03%からなる組成の培地（pH 8.0、50mlを500ml容の瓶口プラスチックに入れて接種後、第1表に示すごとく各種添加剤を各濃度となるように加え、同表に示すパチルス菌培養を接種した。20℃において60時間菌を培養したのち、培養液のスターミラー活性を測定した。

なお、添加剤として使用したサイクロデキストリンとグルコトランスフェラーゼはパチルス・マセランス（*Bacillus macerans*）起源の酵素（天野製薬社製）であり、トランスグルコシダーゼはアスペルギルス・ニガ（*Aspergillus niger*）起源の酵素（同社製）である。また、サイクロデキストリン混合液とは概略に上記サイクロデキストリンとグルコトランスフェラーゼを作用させて調整したスターミラーとサイクロデキストリン約20%、グルコース約4%、マルトース約11%、その他約65%

の混合物であり、イソマルトース混合物とは概略に加水分解物に上記トランスグルコシダーゼを作用させて調整したイソマルトース約35%、パノース約26%、イソマルトリオース約11%、その他のオリゴ糖約28%の混合物である。

添加剤を加えない場合の活性を100%としたときの相対活性を第1表に示す。同表から本発明法による効果がよくわかる。

（以下余白）

例 3 表

添 加 剤	濃度	% cream 100 500	% cream var. excipient (AW 150)	% cream var. excipient (AW 100)	% cream var. excipient (AW 50)	% cream var. excipient (AW 25)	% cream var. excipient (AW 10)
機 油		100%	100%	100%	100%	100%	100%
ローサイクロキサステリン	0.061%	127%	130%	124%	121%	123%	120%
	0.1	155	151	141	135	150	149
ローサイクロキサステリン	0.001	118	126	129	119	126	126
	0.1	151	153	145	138	147	153
ローサイクロキサステリン	0.001	130	151	130	132	130	131
	0.1	151	153	144	147	140	150
サイクロキサステリン混合物	0.001	120	134	120	132	141	145
	0.1	151	151	125	130	138	132
イソマルトーフ	0.061%	115	120%	121%	120%	118%	116%
	0.1	132	135	129	131	128	125
イソマルトーフ混合物	0.001	128	138	130	121	137	124
	0.01	135	127	120	117	135	132
サイクロキサステリン グルコノトランサフェラーゼ	2.01%	167%	168%	159%	148%	166%	154%
トランスグルコシダーゼ	20	130	135	131	140	134	136
マルトール	0.5%	165%	168%	145%	147%	181%	158%
ソルビトール	0.5	189	144	138	131	142	145

## 実施例 2

実施例 1 に示したと同じ組成の増地 500 錠を 500 錠容の瓶口フラスコに入れて殺菌後、ローサイクロキサステリン 90、ローサイクロキサステリン 5、ローサイクロキサステリン 5 の混合物を 0.1%、ローサイクロキサステリン 50、イソマルトーフ 50 の混合物を 0.1% および ローサイクロキサステリン 20、マルトール 80 の混合物を 0.5% となるように加え、パルルス・ポリミキサー ATDC 8523 機を稼働し、28℃において 60 時間振盪培養したところ、相対湿度は各々 169、158、169 % であった。

## 実施例 3

ポリトスターチ 0.5%、ポリペブロン 2.0%、リン酸ニカリウム 0.3%、硫酸マグネシウム 7% 濃 0.1% からなる組成の増地 (pH 7.5) 500 錠を 500 錠容の瓶口フラスコに入れて殺菌後、パルルス・セレスス 100 3001 機で白金耳を稼働し、28℃で 7 時間振盪培養し種培養液とした。次いで、可溶性タンブリン 1.0%、ミルコカゼイン 3.5%、酵母エキス 0.1%、炭化ナトリウム 0.01%、硫酸マ

グネシウム・イ水塩 0.1%、リン酸ニカリウム 0.4%、グリシン 0.075%、ビタミン B<sub>1</sub> 塩酸塩 2ppm、クエン酸ナトリウム 0.03% および ローサイクロキサステリン 0.01% からなる組成の増地 (pH 8.2) 15g の入った 30g 容ジャーファーマンターに上記種培養液を接種し、28℃、60 時間培養した。

培養液を遠心分離して固体を除いたのち、上清を隔昇ろ過濾器、次いでアルコール沈降をすることにより粗ローアマライゼ粉末 93g を得た。

特 許 出 願 人 天 野 製 薬 株 式 有 限 公 司